

GABRIELA ALEXANDRA PRATAS DIAS MARTINS

**PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE NANOPARTÍCULAS
COM PRODUTOS NATURAIS**

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2019

PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE NANOPARTÍCULAS COM PRODUTOS NATURAIS

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 22-11-2019, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º:241/2019, de 30 de Setembro, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro
Rodrigues

Arguente: Profª. Doutora Ana Catarina Reis

Orientador: Profª. Doutora Patrícia Dias Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2019

*“Se os fatos não encaixam na teoria,
modifique os fatos”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, por todo o esforço feito ao longo destes anos. Por toda a ajuda, todo o carinho, amor e confiança que depositaram em mim. Sem eles, não seria possível.

A todos os meus amigos e colegas de faculdade, pelo companheirismo, amizade e momentos partilhados ao longo desta fase das nossas vidas.

Ao João, obrigada por todo o carinho e apoio.

À minha orientadora, Professora Doutora Patrícia Rijo, agradeço a atenção, disponibilidade e, principalmente paciência, fundamentais ao desenvolvimento desta dissertação.

RESUMO

As resistências aos antibióticos tem sido alvo de grande preocupação. A necessidade da descoberta de novos antibióticos é cada vez maior.

Cada vez mais os produtos naturais são vistos como alternativas viáveis à resolução deste problema. O género *Plectranthus*, pertencente à família *Lamiaceae*, possui propriedades antimicrobianas amplamente descritas na literatura. A sua ação bactericida deve-se a metabolitos, nomeadamente a diterpenos.

A nanotecnologia é um campo bastante promissor. As nanopartículas metálicas, em especial as nanopartículas de prata, possuem um grande rácio superfície/volume, que lhes confere a capacidade de interagir com as membranas bacterianas.

A funcionalização das nanopartículas de prata com a 7 α -acetoxi-6B-hidroxiroileanona demonstra viabilidade para o desenvolvimento de uma formulação com propriedades antibacterianas.

Palavras-chave: Resistência microbiana; *Plectranthus*; 7 α -acetoxi-6B-hidroxiroileanona; Nanopartículas de Prata.

ABSTRACT

Antibiotic resistance has been a major concern. The need for the discovery of new antibiotics is increasing.

Natural products are seen as viable alternatives to solving this problem. The genus *Plectranthus*, belonging to the family *Lamiaceae*, has antimicrobial properties widely described in the literature. His bactericidal action is due to metabolites, namely diterpenes.

Nanotechnology is a very promising field. Metal nanoparticles, especially silver nanoparticles, have a large surface to volume ratio, which gives them the ability to interact with bacterial membranes.

Functionalization of silver nanoparticles with 7 α -acetoxy-6B-hydroxyroyleanone demonstrates the feasibility of developing a formulation with antibacterial properties.

Keywords: Microbial Resistance; *Plectranthus*; 7 α -acetoxy-6B-hydroxyroyleanone; Silver nanoparticles.

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

NP – Nanopartículas

AgNP – Nanopartículas de Prata

Co₂/SFC – Fluido Supercritico

TLC – Cromatografia de Camada Fina

DPPH - 1,1-difenil-2-picrihidrazil

AFM – Microscopia de Força Atômica

PCS – Espectroscopia de Correlação de Fótons

Sa - *Staphylococcus aureus*

Se - *Staphylococcus epidermidis*

Sc - *Saccharomyces cerevisiae*

Ca - *Candida albicans*

DMSO – Sulfóxido de Dimetilo

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS.....	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
INTRODUÇÃO	1
CAPITULO 1 - EQUADRAMENTO TEÓRICO	4
PRODUTOS NATURAIS	4
NANOMATERIAIS	5
CAPITULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	7
MATERIAIS.....	7
CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	7
CARACTERIZAÇÃO DAS AgNP	12
EFICIÊNCIA DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS AgNP	13
ESPECTOFOTOMETRIA	13
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	14
CAPITULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	15

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	15
BIOATOGRAFIA.....	15
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	16
SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	17
CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	17
FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM ROYLEANONA.	18
EFICIÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA APÓS A FUNCIONALIZAÇÃO COM A ROYLENANONA	19
CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS	19
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	20
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Tautômero da 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona	5
Figura 2 – Cromatografia de camada fina (TLC)	8
Figura 3 – Métodos Autobiográficos	9
Figura 4 – Esquema geral do método do DPPH	10
Figura 5 – Reação da redução do nitrato de prata pelo boro-hidreto de sódio	11
Figura 6 – Esquema da síntese de AgNP	11
Figura 7 – TLC dos extratos	15
Figura 8 – Imagens da Bioautografia nos extratos em acetona, acetato de etilo e SFC	15
Figura 9 – TLC após reação com o DPPH	16
Figura 10 – Nanopartículas por redução com nitrato de prata	17
Figura 11 - Imagens AFM das AgNP	17
Figura 12 – Distribuição numérica das AgNP	18
Figura 13 – Nanopartículas de prata depois e antes da funcionalização com 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona	18
Figura 14 – Imagens AFM das AgNP funcionalizadas com 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona	19
Figura 15 – Placas de petri com os halos de inibição para as AgNP funcionalizadas e solução de 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona	20

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Eficiência de Associação da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona às AgNP 19

Tabela 2 – Medição dos halos de inibição 20

INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas de saúde mundial é a resistência aos antibióticos. O aumento de infecções provocadas por bactérias multirresistentes a nível hospitalar e comunitário é um problema crescente. A resistência bacteriana é uma das maiores ameaças à saúde humana, uma vez que se a terapêutica usualmente utilizada se tornar insuficiente, irá verificar-se um aumento da morbidade e mortalidade mundial, podendo as mais comuns infecções tornar-se fatais.^(1,2)

A maior causa para a resistência aos antibióticos deve-se ao seu mau uso, sendo o primeiro passo para reverter a evolução da mesma, uma redução do seu consumo. A resistência antimicrobiana é um mecanismo complexo que depende do indivíduo, da estirpe bacteriana e dos mecanismos de resistência que foram desenvolvidos.⁽¹⁾

As plantas medicinais têm também sido alvo de grande interesse e estudo devido à possibilidade de descoberta de novos fármacos. A investigação e desenvolvimento de novos fármacos é um grande investimento e o retorno nem sempre é garantido, por isso mesmo, tem-se estudado fontes naturais já utilizadas. O género *Plectranthus*, pertencente à família *Lamiaceae*, possui cerca de 300 espécies, 62 descritas como uso medicinal e alimentar.^(2,3)

Os metabolitos de origem natural apresentam estruturas químicas complexas, importantes para as interações específicas e reconhecimento dos alvos moleculares nas bactérias patogénicas. Muitas vezes estes metabolitos resultam de forma secundária, biossintetizados para combater e prevenir a proliferação de microorganismos patogénicos para as plantas.^(2,3)

Um grande número de espécies de *Plectranthus* são utilizadas na medicina tradicional no Sul de África. A família *Lamiaceae* é um grupo de plantas com constituintes biologicamente ativos, sendo que as *Plectranthus* não são exceção. A natureza aromática do género é atribuída à produção de óleos essenciais. Estudos fitoquímicos de algumas espécies deste género demonstram a existência de uma grande variedade de componentes incluindo diprtenos e triterpenos.^(2,3)

Os diterpenos são compostos naturais que possuem um esqueleto de carbono constituído por 20 átomos de carbono. Podem ter uma estrutura acíclica, mas na sua maioria constituem estruturas cíclicas e são o segundo maior grupo de terpenos resultante

do metabolismo de plantas. Estes metabolitos naturais possuem diversos papéis com elevada relevância no crescimento, desenvolvimento e resistência da planta ao stress ambiental. As ações farmacológicas dos diterpenos estão relacionadas com a ciclização do esqueleto (bicíclico, tricíclico, tetracíclico ou macrocíclico) juntamente com a aliança a uma vasta gama de grupos funcionais com oxigénio. ^(2,3)

A atividade antibacteriana do género *Plectranthus* é frequentemente citada. É conhecido que tanto os extractos como os metabolitos apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras. ^(2,3)

A 7 α -acetoxi-6 β -hidroxirooleanona é um diterpeno com esqueleto abietânico, isolado a partir das espécies de *Plectranthus*, mais concretamente da *Plectranthus gradidentatus*. Este composto já se encontra descrito na literatura como possuindo propriedades antibacterianas. ^(2,3,5)

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento de interesse na engenharia de nanomateriais como variante antibacteriana, para aplicações, tanto em medicina como em agricultura. A nanotecnologia é um campo promissor pois permite a obtenção de nanomateriais com aplicações biomédicas através da criação de novas estruturas e materiais com propriedades diferentes. ^(1,6,7)

Dentro da nanotecnologia as nanopartículas metálicas demonstram uma mudança única e considerável nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas quando comparadas com partículas metálicas de maiores dimensões. Tais alterações devem-se ao elevado rácio de superfície/volume. ^(1,6,7)

Este elevado rácio aumenta as propriedades bactericidas conferindo às nanopartículas a capacidade de interferir com as membranas dos microrganismos e inibir a formação de biofilmes, causando assim a inativação/exterminação das bactérias. ⁽⁸⁾

As nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas através de vários processos processos distintos, sendo os mais utilizados, o físico e o químico. Quando preparadas por métodos físicos são utilizados métodos como a evaporação/condensação, e quando preparadas por métodos químicos é utilizado um agente redutor, que, em condições favoráveis, quando entra em contacto com os iões metálicos reduz os mesmos, resultando na formação de pequenos agregados metálicos. Os métodos químicos podem ser subdivididos de acordo com a natureza do agente redutor. ^(7,9)

Apesar de os métodos físicos e químicos demonstrarem eficácia na produção de nanopartículas puras e bem definidas, estas técnicas são caras, consomem muita energia e são potencialmente tóxicas para o ambiente. A biossíntese de nanopartículas tem-se tornado assim numa opção fiável e mais sustentável. Os métodos de biossíntese podem empregar tanto microrganismos, plantas vivas, biomassa de plantas e extractos de plantas. (8,10)

A utilização de extratos de plantas tem-se mostrado mais vantajoso para a síntese de nanopartículas metálicas do que a síntese com microrganismos pois evita a elaboração de um processo de cultura de crescimento e manutenção de células. O extrato de planta atua como agente redutor e estabilizador na síntese de nanopartículas limitando o crescimento das mesmas e proibindo a sua aglomeração. (8)

Dentro das partículas metálicas, as nanopartículas de prata têm sido alvo de diversos estudos devido às suas propriedades únicas. A prata, na forma de nitrato de prata ou de sulfadiazina de prata, tem sido utilizada ao longo dos tempos no tratamento de infeções bacterianas associadas a queimaduras e feridas. (1,7,8)

As nanopartículas, apesar de por si só apresentarem características promissoras possuem uma superfície que pode ser funcionalizada com diversas moléculas. Permitem assim administrar os antibióticos já conhecidos ou produtos naturais, em dosagens muito inferiores às utilizadas habitualmente, contribuindo para a diminuição das resistências e dos efeitos secundários. (7,8,9)

CAPITULO 1 - EQUADRAMENTO TEÓRICO

PRODUTOS NATURAIS

Nos últimos anos a resistência aos antibióticos tem aumentado, tornando-se alvo de grande preocupação. O aumento crescente da necessidade de descoberta de novos compostos antimicrobianos tem aumentado o interesse nos produtos naturais. ^(1,2)

Os produtos naturais, utilizados na medicina tradicional, são uma fonte comum para a procura de moléculas bioativas para o tratamento de infeções bacterianas. Um dos géneros que possui diversas aplicações etnobotânicas documentadas, incluindo o tratamento de várias infeções, é o género *Plectranthus*, que pertence à família *Lamiaceae*.^(2,3) As utilizações naturais são apoiadas pelo isolamento de diversos metabolitos que possuem atividade antimicrobiana, nomeadamente diterpenóides e polifenóis. Utilizar os extratos naturais como agentes de terapêutica pode ser uma área interessante e tem despertado interesses em diversas áreas.^(2,14, 15, 16)

Os metabolitos antimicrobianos de origem natural apresentam habitualmente estruturas químicas complexas que podem ser importantes para as interações específicas e reconhecimento dos alvos macromoleculares das bactérias patogénicas. Estes produtos naturais correspondem, usualmente, a metabolitos secundários biossintetizados para o combate e prevenção da proliferação de microrganismos patogénicos. ⁽³⁾

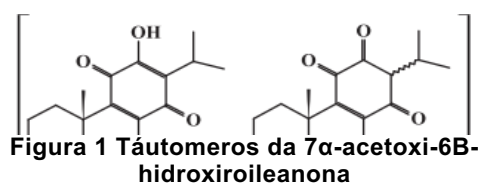
Os estudos fitoquímicos de *Plectranthus* revelaram a presença de uma grande variedade de componentes, incluindo diterpenos e triterpenos. Os diterpenos são compostos naturais com um esqueleto hidrocarbonado com vinte átomos de carbono, o que corresponde a quatro unidades de isopreno (estrutura química de cinco carbonos). O diterpenos podem assumir uma forma acíclica, mas na maior parte são compostos cíclicos e constituem o segundo maior grupo de terpenos resultante do metabolismo de plantas. ^(2,3,16)

Atualmente, são conhecidos mais de dois mil compostos diterpénicos com estruturas distintas, possuindo uma vasta gama de propriedades farmacológicas, incluindo a broncodilatadora, anti-hipertensora, anti-inflamatória, anti-agregante plaquetária e antibacteriana. ⁽³⁾

Esta multiplicidade farmacológica encontra-se relacionada com a diversidade de ciclização do esqueleto (bicíclico, tricíclico, tetracíclico ou macrocíclico) aliada a uma vasta gama de grupos funcionais com oxigénio. A maior parte dos estudos fitoquímicos já realizados teve como finalidade o isolamento e a caracterização destes compostos. ^(15,16)

Existem algumas espécies de *Plectranthus* com aplicações etnofarmacológicas que são usadas pela sua atividade antimicrobiana. Têm sido atribuídas uma variedade de atividades biológicas a plantas deste género, sendo a atividade antibacteriana uma das mais citadas. Tanto os extratos como os metabolitos deste género apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.^(3,17)

A 7 α -acetoxi-6B-hidroxiroileanona é um diterpeno com esqueleto abietânico, isolado a partir das espécies de *Plectranthus*, mais concretamente da *Plectranthus gradidentatus*. Este composto já se encontra descrito na literatura como possuindo propriedades antibacterianas.^(2,3,5)



NANOMATERIAIS

As nanopartículas (NP) são consideradas uma alternativa viável aos antibióticos clássicos. A engenharia de nanomateriais como variante antibacteriana é um campo promissor e em constante evolução, pois permite a síntese de materiais em escala nanométrica, com aplicações biomédicas. Em particular, as nanopartículas metálicas têm sido amplamente estudadas devido às alterações únicas e consideráveis de sofrem nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas quando comparadas com partículas metálicas de dimensões superiores. Estas alterações estão relacionadas com o elevado rácio de superfície/volume.^(1,6,7,19)

O elevado rácio superfície/volume aumenta as propriedades antimicrobianas conferindo às nanopartículas a capacidade de interferir com as membranas de microrganismos e inibir a formação de biofilmes, causando a inativação das bactérias patogénicas.⁽⁶⁾

As nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas de duas formas diferentes, de uma forma física e de uma forma química. Quando preparadas por métodos físicos são utilizados métodos como a evaporação/condensação, e quando preparadas por métodos químicos, é utilizado um agente redutor, em condições favoráveis, que em contacto com os iões de metal reduz os mesmos, resultando na formação de pequenos agregados

metálicos. Os métodos químicos podem ser subdivididos de acordo com a natureza do agente redutor utilizado.^{[6][7]}

As nanopartículas de prata (AgNP) têm sido alvo de diversos estudos devido às suas propriedades únicas. A prata, na forma de nitrato de prata ou sulfadiazina de prata, tem sido utilizada no tratamento de infecções bacterianas associadas a queimaduras e feridas. Contudo, a síntese de nanopartículas de prata utilizando os métodos físicos e químicos convencionais têm pouco rendimento e é difícil a preparação de nanopartículas com tamanhos bem definidos. Os métodos químicos utilizam agentes redutores como o citrato, borohidreto e outros componentes orgânicos.

Na síntese de nanopartículas metálicas a pureza da água e dos reagentes e a limpeza do material de vidro são parâmetros críticos, enquanto que a temperatura da solução, a concentração, os agentes redutores e o tempo de reação influenciam o tamanho das partículas.^[7]

CAPITULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Nitrato de prata, Boro-hidreto de sódio fornecidos pela Sigma-Aldrich (USA), citrato de sódio fornecido pela Sigma-Aldrich (Alemanha), 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona fornecida pelo CBIOS.

Todos os compostos foram usados na forma inalterada. As soluções foram preparadas com água bi-destilada.

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE PLANTAS MEDICINAIS ⁽⁵⁾

A extração foi feita utilizando três solventes diferentes, a acetona, o acetato de etilo e fluído super crítico (CO₂). Os extratos já se encontravam preparados, A 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona é um metabolito produzido numa concentração relativamente alta pela planta *Plectranthus gradidentatus*.

CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Os vários compostos presentes nos extratos foram analisados por cromatografia por camada fina (TLC), a atividade antimicrobiana por Bioautografia e a atividade antioxidante através do método o DPPH.

CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (TLC)^(2,3,12)

A TLC é um tipo de cromatografia planar. É muito utilizada para a identificação de diferentes componentes numa mistura. É um método semi-quantitativo. A TLC é composta por duas fases, a estacionária e a eluente.

A fase estacionária pode conter mais do que um adsorvente, a atividade de um adsorvente é determinada pela sua área superficial, a sua natureza química e o arranjo geométrico dos seus átomos superficiais. Um bom adsorvente deve preencher alguns requisitos: não deve dissolver-se na fase eluente; não deve reagir com a fase móvel; não deve reagir com os solutos utilizados; não deve dar resultados reprodutíveis; o processo

de adsorção deve ser reversível e não deve ser um produto demasiado dispendioso a nível monetário. Os adsorventes podem ser polares ou não polares. Quando utilizados adsorventes polares, a ordem de eluição dos solutos segue a polaridade destes, solutos polares são fortemente retidos (ex. Vários óxidos inorgânicos como a sílica, alumina, magnésia). Os adsorventes não polares, quando utilizados, a ordem de eluição segue a polarizabilidade das moléculas (ex. Carvão ativado).

A fase eluente precisa de ter uma boa qualidade, não devendo variar de lote para lote; não deve reagir, pois se for reativa os resultados são difíceis de interpretar; deve ter um ponto baixo de ebulição (preferível para a secagem da placa) e deve ter alto nível de pureza. A fase eluente deve ser ativa (retirar o soluto da fase estacionária) e seletiva (separar dois ou mais solutos diferentes). O eluente usualmente utilizado é uma mistura de solventes em que a capacidade de eluição não é proporcional à composição.



Figura 2- Cromatografia de Camada Fina (TLC)

Para a TLC foram utilizadas placas de sílica e como eluente a mistura de hexano:acetato de etilo 3:7.

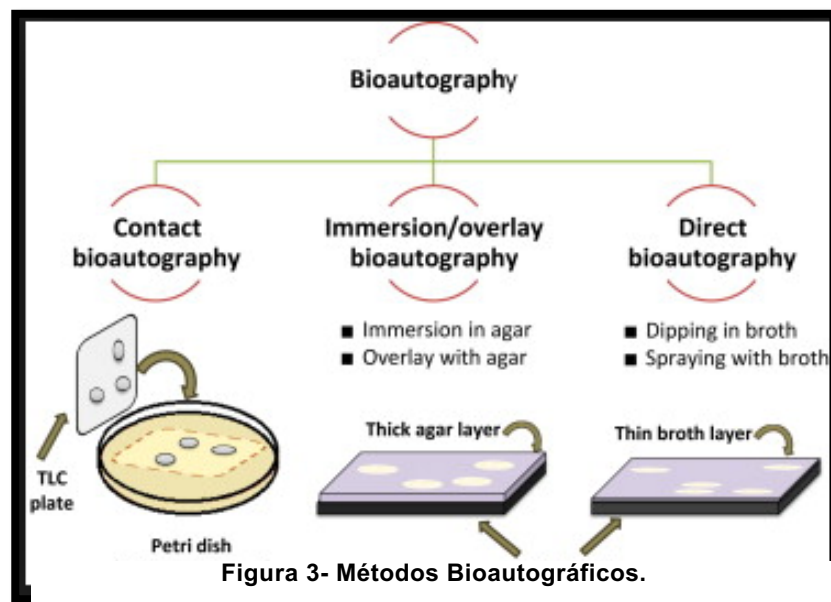
BIOAUTOGRAFIA^(3,12)

A bioautografia é uma técnica que permite a avaliação da capacidade antimicrobiana. É utilizado em conjunto com técnicas de cromatografia em camada fina. Na bioautografia, os cromatogramas, quer sejam placa ou papel, são inoculados em ágar por algumas minutos ou horas, para permitir a difusão dos compostos. Em seguida, a placa é removida da camada de ágar, sendo a mesma incubada. As zonas de inibição de

crecimento aparecem no local onde os compostos com capacidade antimicrobiana estavam em contacto com o ágar.

Na bioautografia de imersão, a placa ou papel cromatográfico são imersos ou cobertos com meio ágar, que após solidificação é semeado com os microrganismos testados e depois incubados. Com o fim de conseguir uma melhor difusão, as placas podem ficar a baixa temperatura durante algumas horas, antes da incubação. Este método é uma combinação da bioautografia de contato e da bioautografia direta, os compostos antimicrobianos são transferidos para o meio ágar pelo cromatograma (método de contato), mas a camada de ágar permanece na cromatografia durante a incubação (método direto).

Entre todos os métodos bioautográficos, o mais utilizado é o direto. Este método pressupõe que seja feita uma placa de TLC, que é posteriormente mergulhada numa suspensão de microrganismos em condições propícias ao seu crescimento, sendo posteriormente incubada numa atmosfera húmida. A superfície sílica da placa de TLC coberta com a suspensão de microrganismos torna-se numa fonte de nutrientes permitindo o crescimento dos mesmos na sua superfície. No entanto, nos locais em que se encontram os compostos com capacidade antimicrobiana irão formar-se zonas de inibição de crescimento.



MÉTODO DO DPPH⁽²⁰⁾

Os antioxidantes podem ter vários benefícios, já que possuem a capacidade de proteger o organismo de danos causados por radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias patologias. Uma das técnicas mais utilizadas atualmente para detectar a presença de compostos antioxidantes é um método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrihidrazil (DPPH⁺). É um método fácil, rápido, simples e económico. É adequado tanto para determinação da atividade antioxidante de substâncias puras ou misturas.

A molécula de DPPH⁺ é um radical orgânico livre estável. Possui uma boa estabilidade na ausência de luz, possui uma boa aplicabilidade, simplicidade e viabilidade. O método do DPPH⁺ é um método colorimétrico, em que o radical livre ao reagir com a substância antioxidante passa de uma coloração roxa a incolor.

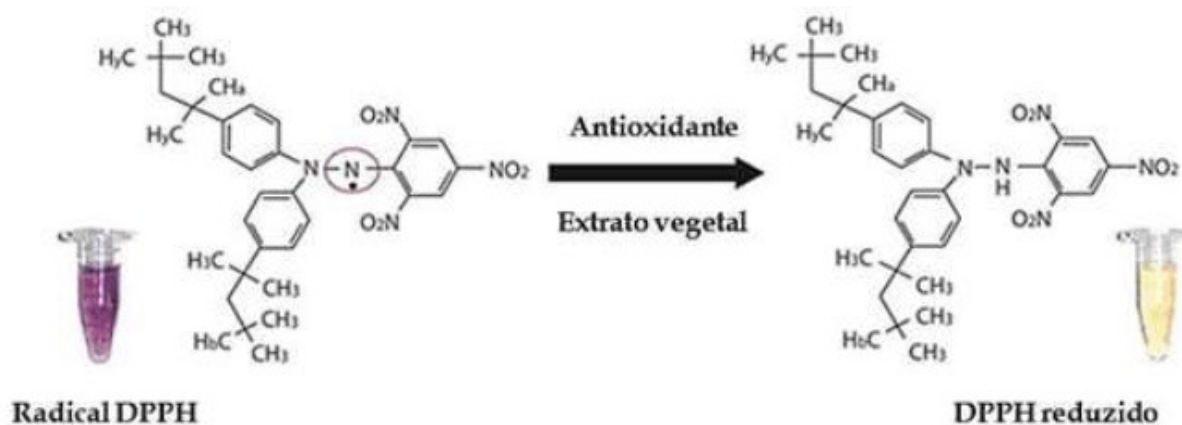


Figura 4- Esquema Geral do Método do DPPH

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNP) ⁽⁹⁾

A nanotecnologia lida com processos que acontecem a escala nanométrica, aproximadamente entre 1 a 1000 nm. A síntese de AgNP foi feita pela redução da prata (na forma de nitrato) pelo boro-hidreto de sódio.

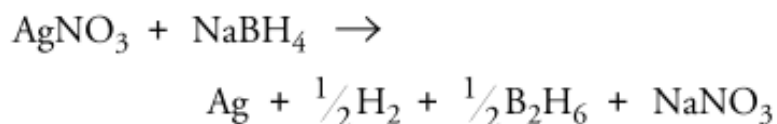


Figura 5- Reação da redução do nitrato de prata pela boro-hidreto de sódio

Para que haja produção e posterior estabilização de nanopartículas, é necessário que o boro-hidreto de sódio seja adicionado em excesso. Foram adicionados, gota-a-gota, por titulação, 10mL de nitrato de prata 1mM a 30mL de boro-hidreto de Sódio 2mM. A solução de boro-hidreto encontrava-se gelada (colocada previamente à síntese 20min no congelador) e a mistura encontrava-se sob agitação vigorosa, feita por um agitador magnético.

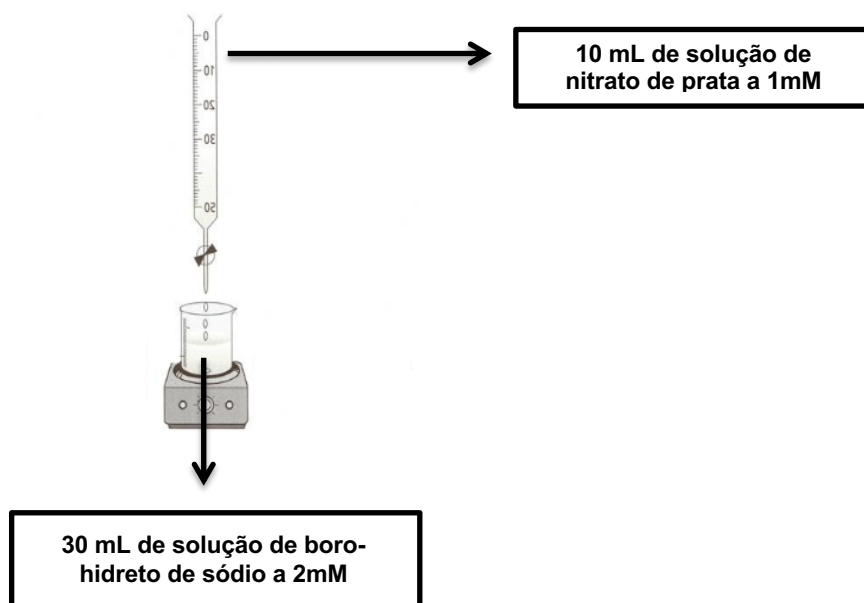


Figura 6- Esquema da síntese de AgNP.

CARACTERIZAÇÃO DAS AgNP

MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA (AFM)⁽²¹⁾

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica que permite a obtenção de imagens reais, em três dimensões, com uma resolução espacial que se aproxima a dimensões atômicas. O microscópio atômico permite caracterizar as propriedades interfaciais dos eléctrodos, possibilitando a observação direta da superfície e morfologia das partículas.

Em AFM é feito o varrimento da superfície da amostra, utilizando uma sonda sensível à força, que consiste numa ponta de dimensões atômicas integradas num braço em movimento. À medida que a ponta se aproxima da superfície, os átomos da ponta interagem com os átomos e as moléculas da superfície do material, provocando uma deflexão do braço. A deflexão do braço é medida através da mudança de direção (angular) de um feixe de laser emitido por um díodo de estado sólido e refletido pelo braço de AFM. O feixe refletido é captado por um fotodetector de fendas em cada posição na superfície, a força de interação entre a ponta de AFM e a amostra traça o diagrama das alturas, constituindo a tipografia da amostra.

Foram colocadas amostras sob mica ou grafite, deixando-se secar durante 24 horas.

ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO DE FOTÕES (PCS)^(7,9)

A espectroscopia de correlação de fótons (PCS) é utilizada para a avaliação de partículas em suspensão. Quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz, a mesma irá refletir a luz em todas as direções. A PCS consiste na análise das flutuações da intensidade da luz espalhada pelas partículas de uma solução ou suspensão, num determinado ângulo.

O estudo do tamanho e distribuição das nanopartículas de prata foi feito pelo PCS (Espectroscopia de correlação de fótons) (Coulter Beckam, Fullerton, CA). As medições foram realizadas à temperatura ambiente.

FUNCIONALIZAÇÃO DAS AgNP COM 7 α -ACETOXI-6 β -HIDROXIROILEANONA

(9)

A funcionalização das AgNP com o diterpeno 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona foi feito na proporção de 1:1. A solução de 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona tinha concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. A mistura foi agitada, moderadamente (através de um agitador magnético), durante 24h, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

EFICIÊNCIA DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS AgNP

Após a funcionalização, as partículas foram centrifugadas, a 27000 rpm a 19°C durante 20 min.

ESPECTOFOTOMETRIA

A espectrofotometria é um método óptico muito utilizado nas investigações biológicas e físico-químicas. Tem como base a medição quantitativa da absorção da luz pelas soluções, onde a concentração na solução da substância absorvente é proporcional à quantidade de luz absorvida.

A quantificação da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona funcionalizada nas nanopartículas foi feita por espectrofotometria (UV-Visível Espectrofotômetro, o Evolution 300, Hertfordshire, Inglaterra), de forma indireta, recorrendo à leitura da absorvância dos sobrenadantes das amostras a um comprimento de onda de 275nm (todas as medições foram realizadas em triplicado).

A quantificação foi feita através de uma curva de calibração, com recurso à lei de Lambert-Beer. A gama de linearidade foi estabelecida entre 7,81 $\mu\text{g/mL}$ a 125 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0,99685$).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS^(2,3,15)

Inicialmente, os microrganismos foram inoculados em meio Muller-Hilton para as bactérias e meio Sabround para as leveduras. Em seguida, foram utilizados 100 µL de uma suspensão de microrganismo padronizado, correspondente a 0,5 McFarland, para inocular uma placa de Petri com meio de Mueller-Hinton sólido (Sabround para as leveduras). Estas suspensões foram espalhadas sobre uma superfície usando uma zaragatoa estéril.

Posteriormente, os poços foram feitos no ágar com uma pipeta de Pasteur. As bactérias testadas foram *Staphylococcus aureus* (Sa), *Staphylococcus epidermidis* (Se) e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Candida albicans* (Ca). Foram colocadas 50 µL de cada amostra, do controlo negativo (DMSO) e dos controlos positivos (vancomicina, anfotericina B ou norfloxacina) a cada um dos poços.

Foi testada a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata, de nanopartículas de prata funcionalizadas com 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona e de uma solução de Royleanona 125µg/mL.

As placas foram incubadas durante 24h, a 37°C. Após o período de incubação, foram medidos os diâmetros das zonas de inibição (ausência de crescimento bacteriano) e os resultados foram apresentados em milímetros.

CAPITULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE PLANTAS MEDICINAIS

A extração foi realizada através de três solventes diferentes, acetona, acetato de etilo e SCF.

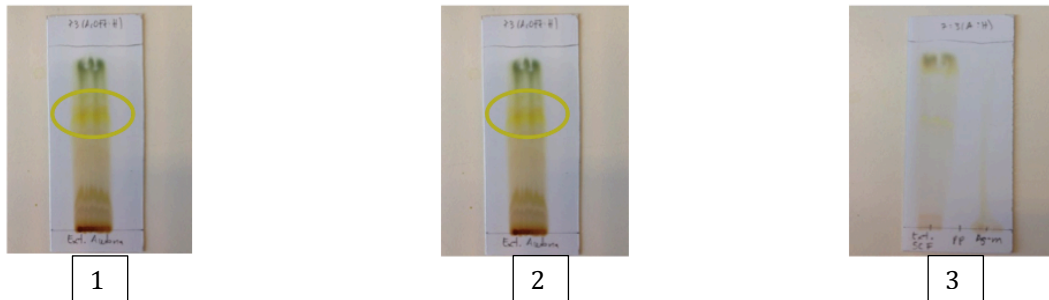


Figura 7- TLC dos Extratos, 1: Solvente acetona; 2: solvente: acetato de etilo; 3: solvente SCF.

Os extratos de acetona e acetato de etilo apresentaram composição semelhante, com identificação de diterpenos (cor amarela). A atividade antibacteriana dos diterpenos já está documentada.

BIOAUTOGRAFIA

A Bioautografia é um método que avalia a capacidade antibacteriana dos compostos. É preparado um meio de ágar Muller Hinton, contendo o corante e uma bactéria (*Staphylococcus aureus*).^(11,12)

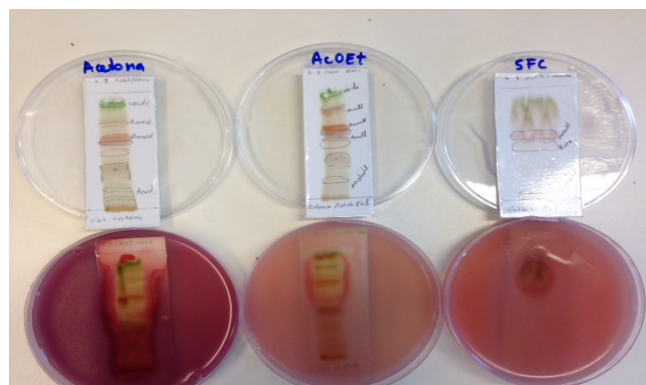


Figura 8- Imagens da Bioautografia nos extratos em acetona, acetato de etilo e SFC.

Verificou-se atividade antibacteriana em dois dos extratos testados. Os cromatogramas mostraram que a atividade antimicrobiana deve-se aos compostos mais apolares (diterpenos), visto que a foi na parte superior do cromatograma que se não se observou uma coloração vermelha (característica do crescimento bacteriano).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante é avaliada através da alteração da cor das TLC's de todos os extratos. Quando o composto possui atividade antioxidante a coloração da TLC passa de roxo a incolor.



Figura 9- TLC após reação com o DPPH.

Verificou-se atividade antioxidante em todos os constituintes de todos os extratos analisados quando comparados com o controlo positivo.

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Todo o material foi lavado com água régia, posteriormente passado por água bi-destilada, de forma a limpar todo o material orgânico que pudesse interferir com a síntese.

As nanopartículas de prata, sintetizadas pelo método anteriormente descrito, deram origem a uma solução de cor amarela (a cor amarela indica a formação de partículas). As AgNP foram conservadas a frio (20°C), ao abrigo da luz.



Figura 10- AgNP, por redução com AgNO_3 .

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A superfície e morfologia das AgNP foram analisadas por AFM, tendo sido obtidas distâncias de superfícies na ordem dos 3nm, com exceções de partículas com maiores dimensões, na ordem dos 30-80nm

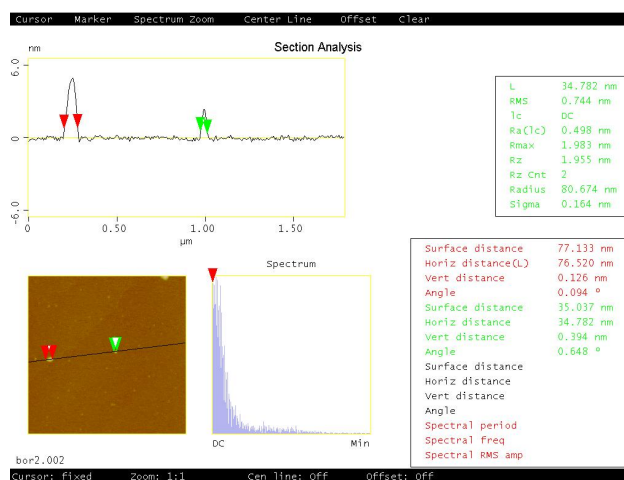


Figure 11 - Esquema AFM das AgNP.

As AgNP foram submetidas a uma avaliação do seu tamanho e distribuição do mesmo. Quanto menor for o valor de dispersão maior é a estabilidade das nanopartículas.

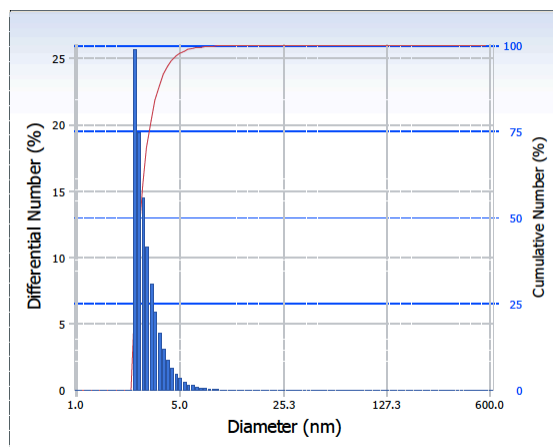


Figura 12- Distribuição numérica das AgNP

O diâmetro médio das nanopartículas foi de $3\text{nm} \pm 0,8$, com um índice de polidispersão de 0,427. Podemos concluir que existiam aglomerados de partículas em suspensão.

FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM 7α -ACETOXI- 6β -HIDROIROILEANONA

Foi utilizada a 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona por ser um diterpeno originado por uma planta que apresenta diversas propriedades, sendo uma delas a sua capacidade antibacteriana.



Figura 13- Nanopartículas depois e antes da funcionalização com 7α -acetoxil- 6β -hidroxiroileanona.

Após a funcionalização verificou-se uma alteração da cor das nanopartículas de amarelo para uma cor rosada. A alteração da cor não interferiu com as propriedades das AgNP.

EFICIÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA APÓS A FUNCIONALIZAÇÃO COM A 7 α -ACETOXI-6 β -HIDROXIROILEANONA

A Espectroscopia UV-visível é uma técnica vastamente utilizada na caracterização de substâncias, foram realizados ensaios para comprimentos de onda na zona do visível, 275 nm.

Abs do sobrenadante (AgNP+Roy)	[μ g/mL] Sobrenadante	[μ g/mL] Nanopartículas	Média [μ g/mL]	% Eficiência de Associação
0,333	33,74	91,26	90,561	72,45
0,346	35,45	89,55		
0,336	34,13	90,87		

Tabela 1- Eficiência de Associação da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona às AgNP

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS

As AgNP funcionalizadas com 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona foram analisadas por AFM. Como era esperado, verificou-se um aumento do tamanho das partículas. As AgNP funcionalizadas apresentaram um tamanho médio de 67nm.

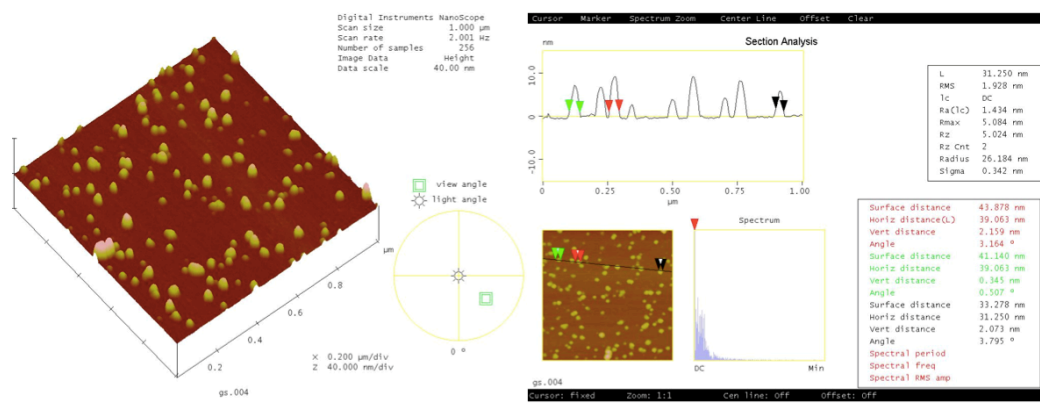


Figura 14- Imagem AFM das AgNP funcionalizadas com Royleanona

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foi testada a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata, de nanopartículas de prata funcionalizadas com 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona e de uma solução de Royleanona 125 μ g/mL.

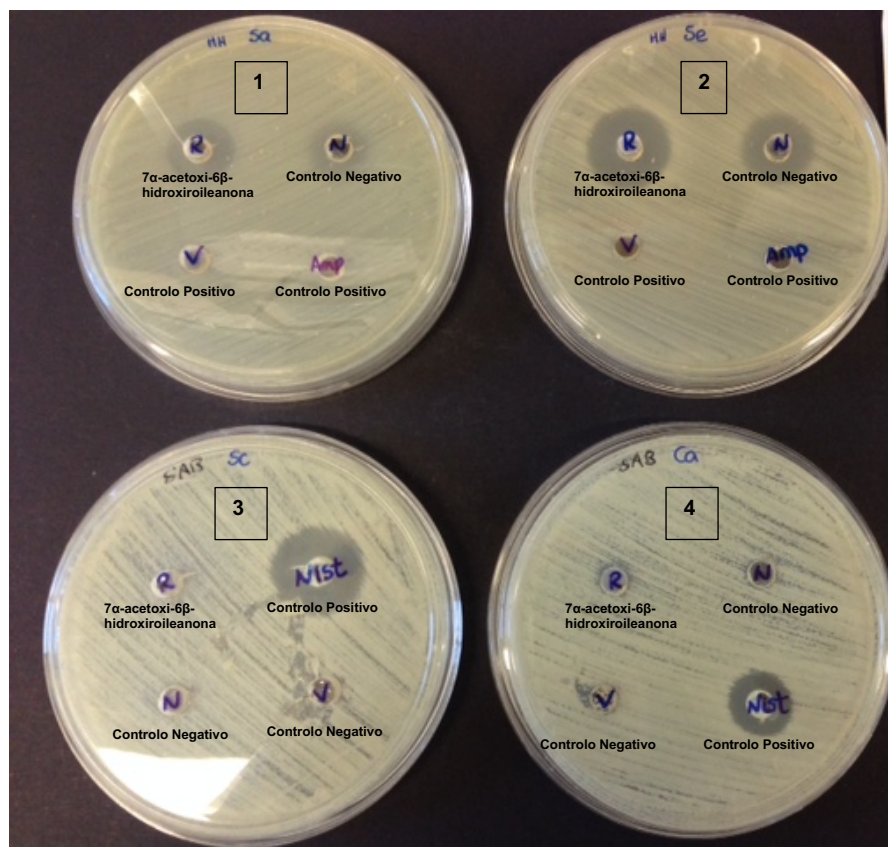


Figura 15- Placas de petri, com os halos de inibição. Placa 1: *Staphylococcus aureus* (Sa); Placa 2: *Staphylococcus epidermidis* (Se); Placa 3: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc); Placa 4: *Candida albicans* (Ca)

	<i>S. aureos</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. cerevisae</i>	<i>C. albicans</i>
AgNP+Roy	11 mm	17 mm	-	-
Royleanona	15 mm	19 mm	-	-

Tabela 2- Medição dos halos de inibição

Verificou-se halos de inibição da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona e das AgNP funcionalizadas para a *S. aureos* e *S. epidermidis*. Não foi apresentada qualquer inibição para as leveduras testadas. Segundo a literatura, as AgNP por si só, possuem capacidade bactericida, o que não foi comprovado. As AgNP não apresentaram inibição para as bactérias estudadas.

CONCLUSÃO

No presente estudo foram preparados diferentes extratos de forma a ser possível a análise de uma possível atividade antimicrobiana dos mesmos. Foram utilizados compostos já descritos na literatura como possuindo atividade antimicrobiana, de forma a testar a sua capacidade sozinho, ou funcionalizado em nanopartículas.

A nanotecnologia é uma área em constante expansão devido às imensas possibilidades que oferece. Os nanomateriais de um determinado composto possuem propriedades diferentes do que o mesmo composto com tamanho superior. Dentro da nanotecnologia, as nanopartículas metálicas têm sido alvo de grande interesse devido ao seu grande rácio superfície/volume. Este rácio confere às nanopartículas a capacidade de interagir com a membrana da bactéria.

As nanopartículas de prata têm sido descritas como possuindo propriedades bactericidas. A prata por si só, é amplamente utilizada no tratamento de infeções. As nanopartículas sintetizadas apresentarem tamanho dentro do intervalo esperado (1-100nm) e um índice de polidispersão baixo, indicando que a suspensão é estável.

Após funcionalização das nanopartículas de prata com a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona as partículas mantiveram as mesmas características físicas, forma redonda, superfície lisa, apenas se verificou um aumento de tamanho. As partículas funcionalizadas apresentaram atividade antibacteriana para a *Staphylococcus aureus* (Sa) e *Staphylococcus epidermidis* (Se).

O estudo realizado permite concluir que a funcionalização de nanopartículas de prata com 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona possui potencial para uma futura formulação com propriedades antibacterianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Graves, J., Thomas, M., & Ewunkem, J. (2017). Antimicrobial Nanomaterials: Why Evolution Matters. *Nanomaterials*, 7 (10), 283.
2. P. Rijo; C.Faustino¹ and M. Fátima Simões, Antimicrobial natural products from *Plectranthus* plants; Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.), 2013, pag 922-931.
3. Pereira, M., Matias, D., Pereira, F., P.Reis, C., Simões, M. F., & Rijo, P. (2017). Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. Neochilus* extracts. *Jornal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12 (1), 127-138. <https://doi.org/10.19277/bbr.12.1.111>.
4. Rice, L. J., Brits, G. J. Potgieter, C. J., & Van Staden, J. (2011). *Plectranthus*: A plant for the future? *South African Journal of Botany*, 77 (4), 947-959.
5. P. Rijo, A. Duarte, A. Francisco et al., In vitro antimicrobial activity of royleanone derivatives against gram-positive bacterial pathogens, *Phytotherapy Research*, 2014, pag 76-81.
6. Sangiliyandi Gurunathan; Jae Woong Han; Deug-Nam Kwon and Jin-Hoi Kim, Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria (2014), *Nanoscale research letters*.
7. Y. Balachandran, S. Girija, R. Selvakumar et al., Differently Environment Stable Bio-Silver Nanoparticles: Study on Their Optical Enhancing and Antibacterial Proprieties, 2013, PLoS ONE, pag 1-14.
8. Allahverdiyev, A. M., Kon, K. V., Abamor, E. S., Bagirova, M., & Rafailovich, M. (2011). Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(11), 1035–1052. <https://doi.org/10.1586/eri.11.121>.
9. S. Salomon, L. Mulfinger, M. Bahadory et al., Synthesis and Study of Silver Nanoparticles, 2007, *Journal of Chemical Education*.
10. Okafor, F., Janen, A., Kukhtareva, T., Edwards, V., & Curley, M. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization, application and antibacterial activity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10), 5221–5238.
11. N. Patil, M. Waghmode, P.Gaikwad et al., Bioautography guided Screening of Antimicrobial Compounds Produced by *Microbispora* (2013), *International Research Journal of Biological Science*, pag 65-68.
12. I. Choma, E. Grzelak, Bioautography detection in thin-layer chromatography, 2011, *Journal of Chromatography A*, pag 2684-2691.

13. A. Brown, K. Smith, T. Samuels et al., Nanoparticles funcionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2012, *Applied and Environmental Microbiology*, pag 2768-2774.
14. Rijo, P.; Gaspar-Marques, C.; Simões, M.F.; Duarte, A.; Apreda-Rojas, M.C.; Cano, F.H.; Rodriguez, B. Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1387–1390.
15. 4. Simões, M.F.; Rijo, P.; Duarte, A.; Barbosa, D.; Matias, D.; Delgado, J.; Cirilo, N.; Rodriguez, B. Two diterpenoids from *Plectranthus* species. *Phytochem. Lett.* 2010, 3, 221–225.
16. Rijo, P.; Simões, M.F.; Francisco, A.P.; Rojas, R.; Gilman, R.H.; Vaisberg, A.J.; Rodriguez, B.; Moiteiro, C. Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus*: Roystone derivatives against mycobacterium tuberculosis strains. *Chem. Biodivers.* 2010, 7, 922–932.
17. P.Rijo, Phytochemical study and biological activities of diterpenes and derivatives from *Plectranthus* species, PhD thesis of University of Lisbon, Lisbon, Portugal, 2011.
18. Jana, S.; Pal, T. Synthesis, characterization and catalytic application of silver nanoshell coated functionalized polystyrene beads. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007, 7, 2151–2156.
19. Solomon, S. D., Mulfinger, L., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. a., & Boritz, C. (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(2), 322.
20. Matias, Diogo, Marisa Nicolai, Ana Sofia Fernandes, Nuno Saraiva, Joana Almeida, Lucília Saraiva, Célia Faustino, Ana María Díaz-Lanza, Catarina P. Reis, and Patrícia Rijo. 2019. "Comparison Study of Different Extracts of *Plectranthus Madagascariensis*, *P. Neochilus* and the Rare *P. Porcatus* (Lamiaceae): Chemical Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities." *Biomolecules* 9(5):1–13.
21. A. M. Oliveira Brett, in *Comprehensive Analytical Chemistry. Biosensors and Modern Specific Analytical Techniques*, L. Gordon (ed.), Elsevier, Oxford, UK, 2004.

